

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/FR05/000753

International filing date: 29 March 2005 (29.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: FR
Number: 04 03242
Filing date: 29 March 2004 (29.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 13 June 2005 (13.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 23 MARS 2005

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr





26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

 0 825 83 85 87
 0.15 € TTC/mn

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

Révisé à l'INPI

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2

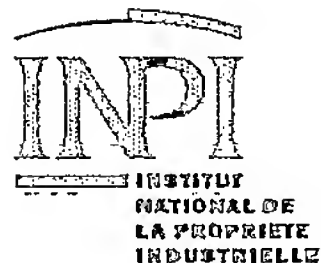


Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 @ W / 030103

REMISE DES PIÈCES DATE 29 MARS 2004 LIEU 75 INPI PARIS B N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 29 MARS 2004 0403242		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET LAVOIX 2 Place d'Estienne d'Orves 75441 PARIS CEDEX 09	
Vos références pour ce dossier (facultatif) BFF 04P0143			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N° _____ Date _____ N° _____ Date _____	
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/> N° _____ Date _____	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Procédé d'amélioration des plantes.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		GENOPLANTE-VALOR	
Prénoms			
Forme juridique		Société par actions simplifiée	
N° SIREN		_____	
Code APE-NAF		_____	
Domicile ou siège	Rue	93 rue Henri Rochefort	
	Code postal et ville	19 102 51 EVRY CEDEX	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
		<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	

Remplir impérativement la 2^{ème} page

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ****REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**
page 2/2**BR2**

29 MARS 2004
REMISE DES PIÈCES
DATE **75 INPI PARIS B**
LIEU **0403242**
N° D'ENREGISTREMENT
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 191203

6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)		
Nom		
Prénom		
Cabinet ou Société		CABINET LAVOIX
Nationalité		
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	2 Place d'Estienne d'Orves
	Code postal et ville	75 14 11 PARIS CEDEX 09
	Pays	FRANCE
N° de téléphone (facultatif)		01 53 20 14 20
N° de télécopie (facultatif)		01 53 20 14 91
Adresse électronique (facultatif)		brevets@cabinet-lavoix.com
7 INVENTEUR (S)		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Choix à faire obligatoirement au dépôt (cf. Notice explicative Rubrique 8)
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition.) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG <input type="text"/>
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) B. DOMENEGO N° 00-0500		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI

La présente invention concerne un procédé pour augmenter la taille des grains d'amidon produits dans les plantes et/ou pour augmenter la teneur des plantes en amidon.

5 L'amidon est le polyside de stockage énergétique chez les végétaux. Il constitue le principal apport calorique de l'alimentation animale et humaine et est également une source majeure de matière première végétale pour des utilisations non alimentaires. L'amidon est composé de deux fractions polysaccharidiques distinctes : l'amylose et l'amylopectine. L'amylose, qui
10 représente la fraction minoritaire de l'amidon, est constitué de résidus glucose unis par des liaisons α -1,4, et présente moins de 1% de ramifications. L'amylopectine, qui représente la fraction majoritaire de l'amidon, est constituée de résidus glucose unis par des liaisons α -1,4, et présente environ 5% de ramifications, constituées par des résidus de glucose liés au polymère principal par une liaison α -1,6. La distribution asymétrique de la ramification de
15 l'amylopectine est responsable de la croissance illimitée des molécules d'amidon et par conséquent des grains d'amidon, et rend également compte de la plupart des propriétés physico-chimiques de l'amidon.

La biosynthèse de l'amidon dépend d'une voie métabolique dont les
20 étapes biochimiques principales sont la synthèse d'ADP-glucose suivie par le transfert de ce précurseur en position α -1,4 sur un glucane par des (ADP-glucose :1,4- α -D-glucane 4- α -D-glucosyl)transférases, le polymère formé étant ramifié par l'action des enzymes dites de ramification ou de « branchement » : les 1,4- α -D-glucane 6- α -D-(1,4- α -D-glucano)-transférases.

25 La dégradation de l'amidon implique plusieurs enzymes, dont l' α -amylase (endoamylase), la β -amylase (exoamylase), l'amyloglucosidase, et l'alpha-glucane phosphorylase (amidon phosphorylase).

Le rôle de ces diverses enzymes de dégradation de l'amidon n'est pas clairement établi. Par exemple, il a été rapporté qu'une expression réduite
30 d'une phosphorylase dans les feuilles, par répression par antisens, n'avait pas d'influence significative sur l'accumulation d'amidon, chez la pomme de terre (Sonnewald et al., 1995).

Puisque la répression par antisens de l'activité α -glucane phosphorylase n'avait pas d'influence significative sur l'accumulation d'amidon dans les feuilles de pommes de terre transgéniques, les auteurs en ont conclu que la rupture de l'amidon n'était pas catalysée par les phosphorylases.

5 Le brevet US 5,998,701 divulgue que la réduction de la teneur en phosphorylase dans les tubercules de pomme de terre a pour conséquence une diminution substantielle de l'accumulation des sucres, ce qui peut être mis à profit pour allonger les durées de stockage des tubercules.

10 Le brevet US 6,353,154 propose, quant à lui, de modifier les activités de l'amidon phosphorylase chez les plantes, en particulier le maïs, dans le but d'obtenir une synthèse d'amidon qui serait modifiée dans sa structure.

15 Les inventeurs ont maintenant mis en évidence que l'inactivation du gène de l'amidon phosphorylase induit une augmentation significative de la taille des grains d'amidon produits dans les plantes, ainsi que de la quantité d'amidon accumulé.

Sur cette base, la présente invention fournit un procédé pour augmenter la taille des grains d'amidon d'une plante ou d'une partie de plante, dans lequel on inactive le gène d'une amidon phosphorylase dans les cellules de la plante.

20 Ce procédé est particulièrement avantageux pour augmenter les rendements lors de l'extraction et de la purification de l'amidon à l'échelle industrielle. En effet, les grains d'amidon les plus petits sont généralement perdus au cours des lavages lors des processus d'extraction et de purification. Une augmentation de la taille des grains permet d'éviter la perte d'une partie
25 des grains d'amidon.

La présente invention fournit également un procédé pour augmenter la teneur en amidon d'une plante ou partie de plante, dans lequel on inactive le gène d'une amidon phosphorylase dans les cellules de la plante.

30 Il faut comprendre que l'augmentation de la taille des grains d'amidon et l'augmentation de la teneur en amidon ne sont pas nécessairement liées, à savoir qu'*a priori* l'augmentation de la teneur en amidon n'implique pas

obligatoirement une augmentation de la taille des grains d'amidon, et vice versa.

La présente demande montre l'existence d'une interaction entre l'amidon phosphorylase, l'amidon synthase, et les enzymes de branchement. La phosphorylase, le cas échéant en interaction avec une glycogénine (WO 03/014365), amorcerait l'initiation de l'amidon en fournissant l'amorce appropriée vis à vis des enzymes de branchement et de l'amidon synthase.

Sans pour autant être liés par cette théorie, on peut émettre une hypothèse pour expliquer l'augmentation de la taille moyenne des grains d'amidon dans les plantes dans lesquelles l'amidon phosphorylase est inactivée. Selon cette théorie, du fait de l'inactivation de la phosphorylase, seule l'amidon synthase (notamment SS 5 chez Arabidopsis, SS I chez le maïs) pourrait interagir avec la glycogénine et initier la synthèse d'amidon. L'interaction plus faible avec la glycogénine, voire également une expression plus tardive, résulterait en un retard dans l'initiation de la synthèse de l'amidon, et donc du nombre de granules produits (initiés). Comme le nombre de molécules d'amidon initiées est moins important mais que les substrats nécessaires à la synthèse de l'amidon sont présents au même niveau, on obtient des grains plus gros car utilisant la même quantité de substrat pour un nombre réduit de granules.

L'invention fournit également un procédé pour l'obtention de plantes ou parties de plante produisant des grains d'amidon de taille accrue, ledit procédé comprenant l'inactivation du gène d'une amidon phosphorylase dans les cellules de la plante.

L'invention fournit par ailleurs un procédé pour l'obtention de plantes, de tissus de plante ou parties de plante à teneur élevée en amidon, ledit procédé comprenant l'inactivation du gène d'une amidon phosphorylase dans les cellules de la plante.

Le terme "tissu de plante" fait référence à n'importe quel tissu d'une plante, dans une plante ou dans une culture. Ce terme inclut des plantes entières, des cellules de plantes, des organes de plantes, des graines de

plantes, des protoplastes, des cals, des cultures de cellules et toutes autres cellules de plantes organisées en tant qu'unité fonctionnelle et/ou structurelle.

L'invention concerne aussi tout tissu de plante susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'invention ainsi que les plantes transgéniques le
5 comprenant.

De plus, les graines issues des plantes obtenues selon l'un des procédés mentionnés selon l'invention caractérisées en ce qu'elles ont une taille accrue, et/ou une teneur en amidon modifiée rentrent dans le cadre de la présente invention.

10 Les « amidon phosphorylases », également connues sous le nom de « alpha-glucane phosphorylases », ont été décrites dans de nombreuses plantes, par exemple la fève, la pomme de terre (Swissprot P04045), la betterave, l'épinard, le maïs (WO 98/40503), le petit pois ainsi que le riz (EMBL n° d'accès D23280 ou Q9AUV8), et le blé (EMBL AAQ73181).

15 La séquence génomique (locus désigné AtPHO-1) codant pour l'amidon phosphorylase d'*Arabidopsis thaliana* est présentée en annexe (SEQ ID N° 1).

L'homme du métier sait comment identifier les phosphorylases à inactiver par exemple par comparaison de séquences entre SEQ ID N°1 avec des séquences d'autres espèces en utilisant un programme informatique de
20 comparaison de séquence tel que Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov) et le programme FastDB avec les paramètres par défauts. Ces algorithmes sont présentés dans Current Methods in Sequencing and synthesis Methods and Applications, pages 127-149, 1988, Ala. R. Liss, Inc, incorporé dans la description par référence. Une autre méthode possible repose par exemple sur
25 l'hybridation sélective dans des conditions de fortes stringence telles que définies dans Sambrook et al. Molecular Cloning A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 1989) aux paragraphes 11.1 à 11.61. En particulier il peut s'agir plus particulièrement de formes alléliques des enzymes citées ci-dessus.

30 L'expression « teneur élevée en amidon » signifie que la plante transgénique obtenue fournit une quantité d'amidon supérieure à une plante de même espèce, non transformée.

« L'inactivation du gène de l'amidon phosphorylase » signifie que le gène est rendu non fonctionnel, c'est-à-dire qu'il ne permet plus ou pratiquement plus l'expression d'une protéine amidon phosphorylase active, la protéine n'étant plus ou pratiquement plus exprimée, ou alors sous une forme mutée non fonctionnelle, incapable d'exercer ses propriétés enzymatiques.

L'inactivation du gène peut être réalisée par tout moyen de l'homme du métier (voir Torneycroft et al., 2001), en particulier par interruption du gène, ou extinction de l'expression génique (« gene silencing »).

Selon un mode de réalisation préféré, on introduit une mutation dans le gène codant pour l'amidon phosphorylase, qui rend ce gène non fonctionnel, à savoir qu'il devient incapable d'exprimer l'enzyme, ou que l'enzyme produite est inactive.

En particulier, la mutation peut consister en une insertion de nucléotide(s), par exemple entre l'exon 6 et l'intron 6 du gène de l'amidon phosphorylase.

L'extinction du gène peut ainsi être réalisée par insertion d'ADN-T.

La séquence SEQ ID N° 2 montre ainsi le gène de l'amidon phosphorylase d'*Arabidopsis thaliana* dans lequel une séquence ADN-T est insérée.

L'invention se rapporte également à l'utilisation de la séquence polynucléotidique SEQ ID N°2 pour la fabrication d'une plante avec une taille des grains d'amidon et/ou la teneur en amidon modifiée. La plante obtenue selon l'invention est choisie parmi la pomme de terre, la fève, la betterave, l'épinard, le petit pois, le blé, le maïs ou le riz.

25

L'ADN-T a été utilisé comme mutagène dès la fin des années 80. Chez *Arabidopsis*, qui ne possède pas de transposons endogènes ayant une activité permettant de faire de la mutagenèse insertionnelle, il a été utilisé préférentiellement aux transposons. La bactérie du sol *Agrobacterium* a la capacité de transférer un morceau de son ADN, l'ADN-T, dans le génome nucléaire des cellules de plantes. Cette propriété est très utile pour inactiver des gènes par mutagenèse d'insertion. Les seuls éléments nécessaires sont des répétitions de 24 paires de base, les séquences bordures, qui délimitent la

30

région à transférer. L'accroissement de l'efficacité des méthodes de transformation a facilité le développement de la génétique inverse.

L'infiltration sous vide de plantes entières a permis d'augmenter l'efficacité de transformation (4 à 5 transformants par plante traitée) de même que la reproductibilité. Récemment, la méthode a encore été simplifiée avec l'apparition du « floral dip ». Les inflorescences sont simplement trempées dans une suspension d'*Agrobacterium* en présence d'un surfactant, le Silwet L-77 et de saccharose. Avec ces différentes méthodes, tous les transformants obtenus sont hémizygotes pour l'ADN-T, ce qui suggère une transformation tardive au cours du développement floral. La cible de transformation a été identifiée comme étant l'ovule en développement. Les mutations létales à l'état homozygote sont maintenues dans la population sous forme de plantes hétérozygotes. On obtient en moyenne une à deux insertions par plante. Les analyses de ségrégation montrent que 57 % des transformants contiennent 1 locus d'insertion, 25 % 2 locus, 8 % 3 locus et 2 % plus de 3. Une analyse moléculaire des mutants étiquetés montrent que ces insertions se font au hasard, sont stables, maintenues dans la descendance et qu'il y a peu de biais d'insertions.

L'inactivation du gène de l'amidon phosphorylase endogène peut également être obtenue par mutagenèse des cellules de plante, par exemple par irradiation U.V, par un agent mutagène chimique, ou par insertion de transposons.

Les éléments transposables ont la capacité de perturber l'expression de gènes dans lesquels ils sont insérés et de générer des délétions, réarrangements, et mutations au locus cible.

Les transposons ont été les premiers agents insertionnels mutagènes utilisés chez le maïs puis chez le pétunia et *Antirrhinum*. Contrairement à l'ADN-T, le transposon peut être excisé du gène disrupté en présence d'une transposase. La haute fréquence de réversion de la mutation qui en résulte permet de confirmer qu'elle est induite par le transposon. La remobilisation des transposons permet aussi de générer des mosaïques : un mutant homozygote qui porte une transposase active aura des secteurs somatiques qui ont perdu

le transposon Ds et restauré la fonction du gène. Ceci permet de déterminer le site d'action d'un gène en combinaison avec son patron d'expression. D'autre part, pour les transposons de type Ac/Ds, la plupart des événements de transposition se produisent à des sites génétiquement liés. S'il existe un
5 élément transposable près d'un gène d'intérêt, il pourra donc être remobilisé pour se réinsérer dans le gène ou à proximité (Ito et al, 1999). Il est ainsi possible de faire de la mutagenèse locale dans une région d'intérêt particulier.

Une technique de mutagenèse par transposons qui peut être avantageusement utilisée est la mutagenèse par transposon Mutator confirmée
10 par un criblage en génétique inverse (Bensen et al., 1995 ; Das et al., 1995). Cette technique met en œuvre les étapes consistant à croiser une lignée "Mutator" avec des hybrides des plantes d'intérêt puis à cribler les plantes F1 obtenues par PCR avec une amorce spécifique des transposons et une amorce spécifique de la séquence nucléotidique codant pour l'amidon
15 phosphorylase. Les graines F2 obtenues à partir des plantes criblées F1 permettent d'obtenir des plantes dont le phénotype est alors analysé.

Une autre méthode pour inactiver le gène de l'amidon phosphorylase est l'injection locale d'ARN double brin (RNA interference : RNAi) (Fire, 1999). Les ARN double-brin sont clivés en petits ARN sens et antisens de 22 nucléotides
20 environ qui vont cibler la dégradation des ARNm endogènes homologues (Zamore et al., 2000). L'expression constitutive d'ARN double brin par un transgène mettant en jeu des séquences inversées répétées placées sous le contrôle du promoteur 35S permet d'obtenir une inactivation efficace dans l'ensemble de la plante, y compris dans le méristème (Waterhouse et al.,
25 1998). Cette stratégie est très efficace tout au long du développement des plantes.

L'inactivation du gène d'une amidon phosphorylase endogène peut être par ailleurs réalisée selon le procédé comprenant les étapes consistant à :

- a) fournir un vecteur d'expression comprenant une séquence
30 nucléotidique antisens du gène codant pour ladite amidon phosphorylase endogène;
- b) transformer une cellule de plante avec ledit vecteur d'expression ;

c) régénérer la plante à partir de la cellule transformée à l'étape b, ladite plante transgénique ainsi obtenue présentant des grains d'amidon de taille accrue, d'une teneur en amidon élevée.

Une autre possibilité pour réduire l'activité de l'amidon phosphorylase dans les cellules des plantes est d'exprimer des ribozymes qui sont des molécules d'ARN qui agissent comme des enzymes catalysant spécifiquement le clivage des transcrits codant pour l'amidon phosphorylase, par des techniques connues de l'homme du métier (EP 321 021).

Il est également possible d'obtenir une plante présentant une altération de l'expression d'amidon phosphorylase par le procédé dit "transwitch" décrit dans WO90/12084.

L'inactivation du gène de l'amidon phosphorylase peut également être obtenue en infectant les plantes par des virus recombinants dans lesquels une partie de la séquence codante ou du promoteur du gène à inactiver a été introduite (virus-induced gene silencing ou VIGS) (Ratcliff et al., 2001). Pour expliquer ce phénomène, on pense que les molécules virales de polarités positives et négatives produites au cours du cycle de réplication du virus sont reconnus comme des ARN double brin et dégradées en petits ARN sens et antisens de 22 nucléotides qui vont à leur tour déclencher la dégradation des ARNm endogènes homologues. Toutefois, seuls les ARNm endogènes sont totalement dégradés alors que les ARN viraux restent détectables. La présence de petits ARN de 22 nucléotides dérivés des ARN viraux, suggère que les virus qui induisent le VIGS sont également capables d'y résister. Les avantages de cette méthode sont avant tout sa simplicité et la rapidité de sa mise en oeuvre. De plus, il suffit de cloner 23 paires de base d'un gène dans le virus pour cibler spécifiquement son inactivation.

La construction des vecteurs d'expression utilisés (portant par exemple une séquence antisens du gène de l'amidon phosphorylase endogène) ou des ARNi est à la portée de l'homme du métier suivant les techniques standard.

La transformation de cellules végétales peut être réalisée par transfert des vecteurs ou des acides nucléiques dans les protoplastes, notamment

après incubation de ces derniers dans une solution de polyéthylèneglycol en présence de cations divalents (Ca^{2+}).

La transformation des cellules végétales peut également être réalisée par électroporation notamment selon la méthode décrite dans l'article de
5 Fromm et al., 1986.

La transformation des cellules végétales peut également être réalisée par utilisation d'un canon à gène permettant la projection, à très grande vitesse, de particules métalliques recouvertes des séquences d'ADN d'intérêt, délivrant ainsi des gènes à l'intérieur du noyau cellulaire, notamment selon la
10 technique décrite dans l'article de Sanford, (1988).

Une autre méthode de transformation des cellules végétales, est celle de la micro-injection cytoplasmique ou nucléaire.

Selon un mode de réalisation particulièrement préféré du procédé de l'invention, les cellules végétales sont transformées par biolistique, c'est-à-dire
15 par projection; au moyen d'un canon à particules, de microparticules recouvertes des séquences nucléotidiques à transférer (J. Finner, 1992).

Selon un autre mode de réalisation du procédé de l'invention, les cellules végétales sont transformées par un vecteur selon l'invention, ledit hôte cellulaire étant susceptible d'infecter lesdites cellules végétales en permettant
20 l'intégration dans le génome de ces dernières, des séquences d'ADN d'intérêt initialement contenues dans le génome du vecteur susmentionné.

Avantageusement, l'hôte cellulaire susmentionné utilisé est *Agrobacterium tumefaciens*, notamment selon la méthode décrite dans l'article d'An et al., 1986, ou encore *Agrobacterium rhizogenes*, notamment selon la
25 méthode décrite dans l'article de Jouanin et al., 1987.

De manière préférentielle, la transformation des cellules végétales est réalisée par le transfert de la région T du plasmide circulaire extra-chromosomique inducteur de tumeurs Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*, en utilisant un système binaire (Watson et al.).

30 Pour ce faire, deux vecteurs sont construits. Dans un de ces vecteurs, la région d'ADN-T a été éliminée par délétion, à l'exception des bords droit et gauche, un gène marqueur étant inséré entre eux pour permettre la sélection dans les cellules de plantes. L'autre partenaire du système binaire est un

plasmide Ti auxiliaire, plasmide modifié qui n'a plus d'ADN-T mais contient toujours les gènes de virulence *vir*, nécessaires à la transformation de la cellule végétale. Ce plasmide est maintenu dans *Agrobacterium*.

5 Parmi les terminateurs de transcription pouvant être utilisés, on peut citer le terminateur polyA 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV), décrit dans l'article de Franck et al., (1980), ou le terminateur polyA NOS, qui correspond à la région en 3' non codante du gène de la nopaline synthase du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* souche à nopaline (Depicker et al., 1982).

10 Parmi les promoteurs de transcription pouvant être utilisés, on peut citer notamment :

- le promoteur 35S, ou avantageusement le promoteur constitutif double 35S (pd35S) du CaMV, décrits dans l'article de Kay et al., 1987 ;

- le promoteur PCRU du gène de la cruciférine de radis permettant 15 l'expression des séquences associées uniquement dans les semences (ou graines) de la plante transgénique obtenue ;

- les promoteurs PGEA1 et PGEA6 correspondant à la région 5' non codante des gènes de la protéine de réserve de graines, GEA1 et GEA6, respectivement, d'*Arabidopsis thaliana* (Gaubier et al., 1993) et permettant une 20 expression spécifique dans les graines ;

- le promoteur chimérique super-promoteur PSP (Ni M et al., 1995), constitué de la fusion d'une triple répétition d'un élément activateur transcriptionnel du promoteur du gène de l'octopine synthase d'*Agrobacterium tumefaciens*, d'un élément activateur transcriptionnel du promoteur du gène de 25 mannopine synthase et du promoteur mannopine synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* ;

- le promoteur actine du riz suivi de l'intron actine de riz (PAR-IAR) contenu dans le plasmide pAct1-F4 décrit par Mc Elroy et al., 1991 ;

- le promoteur HMGW (High Molecular Weight Glutenine) d'orge ;

- 30 - le promoteur du gène de γ zéine de maïs (Pyzéine) contenu dans le plasmide py63, et permettant l'expression dans l'albumen des semences de maïs.

Parmi les cellules végétales susceptibles d'être transformées conformément à la présente invention, on peut citer celles de la pomme de terre, la fève, la betterave, l'épinard, le petit pois, le blé, le maïs ou le riz.

La présente invention permet aussi d'obtenir une plante ou partie de
5 plante telle que notamment la pomme de terre, le blé, le maïs ou le riz, produisant des grains d'amidons de taille accrue, ou une teneur élevée en amidon.

Par « partie de plante », on entend notamment les organes de réserve naturellement riches en amidon, tels que les graines ou les tubercules. Par
10 « partie de plante », on entend également les cellules de ladite plante.

L'extraction de l'amidon produit peut être réalisée selon les techniques standard connues de l'homme du métier. La solubilisation de l'amidon est également connue de l'homme du métier et peut être réalisée par trempage et
15 fractionnement du grain d'amidon, ou par exemple par chauffage. De manière alternative, on peut utiliser des enzymes destructurant l'amidon, telles que les amylases.

L'amidon produit peut également être utilisé dans de nombreuses industries : industrie du papier et du carton, industrie des adhésifs, industrie
20 textile, industrie pharmaceutique (pour la formulation des médicaments), etc.

L'amidon produit peut également subir d'autres modifications, en particulier des modifications chimiques telles qu'un traitement acide, une oxydation, une estérification, etc avant son utilisation.

Cet amidon peut être utilisé pour la préparation de produits dérivés,
25 notamment de produits alimentaires.

Les figures et exemples suivants illustrent l'invention sans en limiter la portée.

30 LEGENDE DES FIGURES :

La figure 1 est un schéma représentant le génome d'*Arabidopsis thaliana*.

La figure 2 est un graphe montrant les niveaux relatifs d'accumulation d'amidon dans la lignée mutante par rapport à la lignée sauvage de référence (WS).

La figure 3 est une comparaison de profils d'analyse spectrophotométrique d'amidon des lignées sauvage et mutante après chromatographie d'exclusion stérique sur matrice de sépharose CL-2B.

La figure 4 est une comparaison de photographies de vues au microscope électronique à transmission, de grains d'amidon (agrandissement x3000).

EXEMPLES :

1. Description de la lignée mutante:

Les inventeurs ont étudié les phénotypes d'une lignée mutante d'*Arabidopsis thaliana*, produit par interruption d'un gène de l'amidon phosphorylase (locus désigné AtPHO-1).

Cette lignée (DDS72) est l'une des 50 000 lignées mutantes produites par insertion aléatoire d'ADN-T, comme décrit par Balzuergue et al., 2001.

La lignée mutante DDS72 d'*Arabidopsis thaliana* étudiée présente une insertion d'ADN-T à la jonction de l'exon 6 et de l'intron 6 (cf figure 1 et SEQ ID N° 2).

2. Analyse enzymologique de la lignée mutante :

Afin de déterminer l'impact de l'insertion de l'ADN-T au locus AtPHO-1 sur l'activité des amidon-phosphorylases, les inventeurs ont effectué des zymogrammes à partir d'extraits cellulaires de diverses lignées mutantes et sauvages (WS). Les zymogrammes ont été réalisés dans deux conditions différentes.

- Extraction des protéines des feuilles

Les feuilles sont broyées à 4°C à l'aide du Polytron Blender dans le tampon suivant : 50 mM NaH₂PO₄, 0,5 M NaCl. Le broyat est centrifugé 5

minutes à 13000 rpm à 4°C et on récupère le surnageant contenant les protéines solubles.

- Electrophorèse en gel de polyacrylamide

Les gels sont réalisés avec les chambres d'électrophorèse MiniProtean
5 Il commercialisés par BioRAD (Richmond, CA, USA). Les gels ont une
épaisseur de 1,5 mm. La concentration finale en monomère est de 7,5% (p/v)
pour le gel de séparation, il contient également 0,45% de glycogène de foie de
lapin ou 0,2% d'amidon de pomme de terre. Il est tamponné par le Tris/HCl
110mM pH 7,2. Le gel de concentration à 2,5% final en monomère est
10 tamponné par le Tris/H₃PO₄ 60mM pH 7,3. Le tampon de migration utilisé pour
l'électrophorèse est le Glycine/Tris 40mM pH 8,5.

A 100 µg d'extrait protéique, sont ajoutés 10 µl de Tris/H₃PO₄ 60mM pH
7,3 et 20 µl de tampon de chargement : saccharose 25% (p/v), bleu de
bromophénol 0,001%.

15 La migration se déroule à 4°C durant 2h30 à 15mA et 250V. A l'issue de
celle-ci, le gel est équilibré dans le Citrate/NaOH 100mM pH 7,0 pendant 10
minutes avant d'être incubé toute la nuit à température ambiante dans le
citrate/NaOH 100mM pH 7,0, Glucose-1-phosphate 50 mM.

A cette concentration, les phosphorylase fonctionnent dans le sens de la
20 synthèse des polysaccharides en ajoutant un résidu de glucose en extrémité
non-réductrice des glycanes disponibles par l'intermédiaire d'une liaison α -1,4.
L'activité est ensuite révélée par coloration du gel à l'iode.

C'est la forme de migration rapide (sur glycogène ou amidon) qui
disparaît totalement dans le mutant au locus AtPHO-1.

25

3. Impact de la mutation sur le polysaccharide de réserve :

- Extraction d'amidon des feuilles d'*Arabidopsis thaliana*

Les feuilles d'*A. thaliana* sont prélevées en fin de photopériode puis
30 rincées deux fois dans un grand volume d'eau désionisée (afin de retirer les
débris non désirés). Dans la glace, on broie le matériel dans 15-25 ml de
tampon d'extraction (MOPS 100 mM pH 7.2, EDTA 5 mM, Ethylène glycol
10%) à l'aide du Polytron Blender (broyeur de tissus) jusqu'à obtenir un extrait

bien homogène sans aucun tissu intact. On passe l'extrait 4 x 15 secondes au sonicateur « continu » et entre chaque sonication, on plonge le tube dans la glace. Centrifuger 15 minutes à 3200 g à 4°C. Le culot est repris dans 20 ml de Percoll (Amersham Biosciences) à 90% et centrifugé 40 minutes à 10000 g dans un tube en verre de type Corex. On retire les débris en surface et le surnageant. Le culot d'amidon est rincé cinq fois par de l'eau désionisée avant son analyse.

- Dosage de l'amidon

L'amidon est dosé à l'aide du kit Enzytec commercialisé par Diffchamb (Lyon, France). Les glucanes sont digérés par une amyloglucosidase qui hydrolyse les liaisons O-glycosidiques α -1,4 et α -1,6. Les molécules de glucose ainsi libérées sont ensuite phosphorylées en position 6 par une hexokinase. Le glucose-6-phosphate produit est ensuite oxydé en gluconate-6-P par une G6P déshydrogénase en réduisant le NADP en NADPH. Cette dernière réaction est suivie au spectrophotomètre à 365 nm.

La quantité d'amidon dosée est présente au tableau 1 :

Tableau 1 :

Lignée	Quantité d'amidon (en mg/g de feuilles)
<u>WS (lignée sauvage)</u>	1,16
AtPHO-1 (lignée DDS72)	2,78

La figure 2 présente les niveaux relatifs d'accumulation d'amidon dans les différentes lignées par rapport à la lignée sauvage de référence (WS).

La structure de l'amidon est ensuite analysée par chromatographie d'exclusion stérique sur matrice de sépharose CL-2B.

- Fractionnement de l'amidon

Le fractionnement est réalisé par chromatographie d'exclusion stérique sur matrice de sépharose CL-2B (Amersham-Biosciences, Suède).

La colonne possède un diamètre interne de 0,5 cm et une hauteur de 65 cm. Equilibrée dans la soude 10 mM, son débit est de 12 ml/heure. La préparation de l'échantillon d'amidon est effectuée comme suit : on dissout

1,5mg d'amidon natif dans 200 µl de DMSO 100% à 100°C pendant 10 minutes. Le polysaccharide est ensuite précipité par 4 volumes d'éthanol pur à -20°C pendant 30 min. Après centrifugation à 5000 g pendant 5 minutes, le culot d'amidon est dissous dans 500 µl de soude 10 mM puis déposé sur la
5 colonne. Les fractions de 300 µl sont analysées par spectrophotométrie à l'iode.

- Détermination de la λ_{\max} du complexe iode-polysaccharide :

La longueur du maximum d'absorbance du complexe formé par l'iode avec les polysaccharides est déterminée par spectrophotométrie. 100 µg
10 d'amidon sont dissous dans le DiMéthylSulfOxyde (DMSO) 100% durant 10 minutes à 100°C. Cette solution est ensuite ramenée à 10% en DMSO. A 400 µl de cette solution, sont rajoutés 100 µl d'une solution d'iode 0,02% I₂ et 0,2% KI. Le spectre d'absorption est réalisé entre 400 et 700 nm.

On peut également déterminer les quantités de polysaccharides
15 présentes dans chaque fraction à l'aide du kit de dosage Enzytec.

Il ne semble pas y avoir de modification particulière de la structure de l'amidon de la lignée mutante AtPHO-1 si on fait la comparaison entre les deux profils présentés à la figure 3.

20 **4. Analyse de la structure de l'amidon accumulé par la lignée AtPHO-1 par microscopie électronique :**

- Préparation des échantillons pour la microscopie électronique à transmission

Les échantillons sont inclus dans l'agar à 3% dans l'eau. Ils sont ensuite
25 traités au PATAg : acide périodique-thiosemicarbazide-argent avec un temps d'incubation de 20 minutes dans l'acide périodique. On réalise ensuite une inclusion dans une résine hydrophile (nanoplast) pendant 10 jours avant de consolider la préparation par une inclusion dans une résine LR-White Hard grade. Les coupes sont effectuées à l'ultramicrotome (microme MT-7000) avec
30 une épaisseur de 60 à 100 nm. Les observations sont effectuées au MET (Jeol 100S) à 80keV (figure 4).

Les images obtenues ont été analysées en repérant les paramètres suivants :

- surface totale,
- diamètre équivalent,
- 5 - rapport des différentes longueurs.

Les valeurs sont traitées grain par grain.

S'agissant de la lignée sauvage, les tailles sont très variées : on note la présence importante d'assez gros grains mais aussi de quelques très petits. Sur 556 grains analysés, le diamètre équivalent moyen est de 1.27 μm . Les
10 grains de forme allongée semblent majoritaires.

S'agissant de la lignée mutante, les grains sont de grosse taille et de formes plus arrondies (convexes) avec une présence de grains anguleux. 256 grains ont été analysés.

L'analyse statistique montre que les grains d'amidon de la lignée
15 mutante au locus AtPHO-1 sont en moyenne plus gros que ceux de la lignée sauvage.

Ainsi, deux modifications majeures sont observées en ce qui concerne l'amidon dans la lignée mutante au locus AtPHO-1 chez *A. thaliana* :

- 1) une augmentation de la taille moyenne des grains d'amidon dans la
20 lignée mutante,
- 2) une augmentation significative de la quantité d'amidon accumulée dans les feuilles.

25 5. Interaction entre l'amidon phosphorylase, l'amidon synthase, et les enzymes de branchement :

La phosphorylase est l'une des premières enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'amidon ; qui apparaît dans les amyloplastides de l'endosperme du maïs. L'enzyme continue à présente tout au long du processus de biosynthèse de l'amidon et est la seconde enzyme la plus abondante dans ce
30 processus (après l'enzyme Ilb de branchement). Des études de zymogrammes sur gels natifs ont permis d'identifier une zone où trois activités différentes sont présentes (amidon synthase soluble SSS ou SS ; enzymes de branchement SBE, et phosphorylase), suggérant l'existence d'un complexe incluant les

enzymes responsables de ces activités. De plus le fractionnement enzymatique couplé à des zymogrammes a montré une interaction entre l'amidon phosphorylase et les enzymes de branchement.

5 Ces zymogrammes ont fait appel aux conditions suivantes :

Le principe des zymogrammes est soumettre les enzymes à une séparation par électrophorèse, les gels d'électrophorèse étant ensuite trempés dans une solution déclenchant la réaction enzymatique là où l'enzyme a migré.

10 Pour révéler l'amidon phosphorylase, la solution mise en contact avec le gel contient du glucose 1-phosphate, substrat de l'enzyme. La réaction enzymatique produit la génération et l'élongation de glucane linéaire. Les bandes bleues apparaissent là où l'enzyme a migré.

15 Pour révéler l'amidon synthase, la solution mise en contact avec le gel contient de l'amylopectine et de l'ADP-glucose, substrats de l'enzyme. La réaction enzymatique produit l'élongation des chaînes d'amylopectine avec l'ADP-glucose. Les bandes bleues apparaissent là où l'enzyme a migré.

20 Pour révéler les enzymes de branchement (SBE), la solution mise en contact avec le gel contient du glucose 1-phosphate, substrat de l'enzyme, et une phosphorylase b exogène (de lapin). La réaction enzymatique produit la génération et l'élongation de glucanes linéaires avec le glucose 1-phosphate, glucanes qui sont branchés par les SBE. Des bandes brunes apparaissent là où l'enzyme a migré.

25 D'autres études chez des mutants du maïs et des maïs doubles transgéniques (a/aSBE2b et a/s SSI) ont montré que le domaine des activités enzymatiques multiples observé sur les gels natifs était composé d'au moins la SSI, SBE2b et la phosphorylase. Sans être liés par cette théorie, il est probable au vu de l'interaction de la phosphorylase avec les enzymes directement impliquées dans la biosynthèse d'amidon, que l'amidon phosphorylase est
30 impliquée également dans la biosynthèse de l'amidon.

En raison de l'existence de ce complexe et parce que la phosphorylase apparaît de manière précoce par rapport à l'AGPase ou la SSI dans l'endosperme de maïs, on peut émettre l'hypothèse que l'amidon



phosphorylase, en utilisant la glucose 1-phosphate, génère une chaîne naissante de polymère de glucose qui agirait comme amorce pour les activités des enzymes SBE2b et SSI dans l'amyloplaste du maïs.

BIBLIOGRAPHIE

- An G. (1986), Plant Physiol. 81 : 86-91
- 5 - Balzergue et al. (2001) Bio Techniques, Vol 30, 496-504
- Bensen et al. (1995), The Plant Cell, Vol. 7, 75-84
- Das et al. (March 1995), The Plant Cell, Vol. 7, 287-294
- 10 - Depicker et al. (1982) J. Mol. Appl. Genet., 1, 561-573
- Finner J. et al. (1992), Plant Cell Reports, 11, 323-328
- 15 - Fire et al. (1998) Nature 391, 806-811
- Franck et al. (1980) Cell. 21, 285-294
- Fromm et al. (1986) Nature, vol. 319, 791-793
- 20 - Gaubier et al. (1993) Mol. Gen., 238, 409-418
- Ito et al. (1999) Plant J., Vol 17, 433-44.
- 25 - Jouanin (1987) Plant. Sci., 53, 53-63
- Kay (1987) Science, 236, 1299-1302
- Mc Elroy (1991) Mol. Gen. Genet. 231 : 150-160
- 30 - Ni et al. (1995) Plant J., 7, 661-676
- Ratcliff et al. (2001) Plant J. 25, 237-245

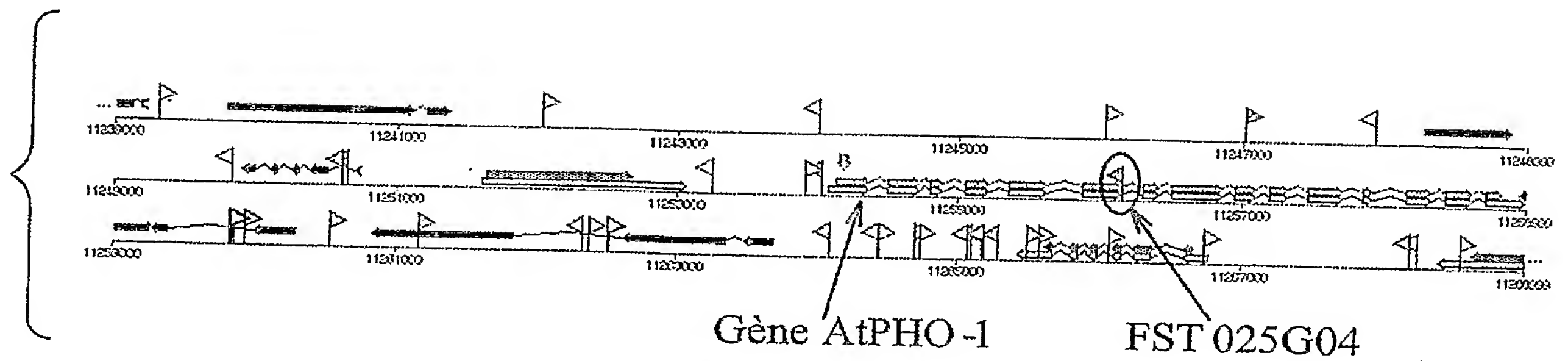
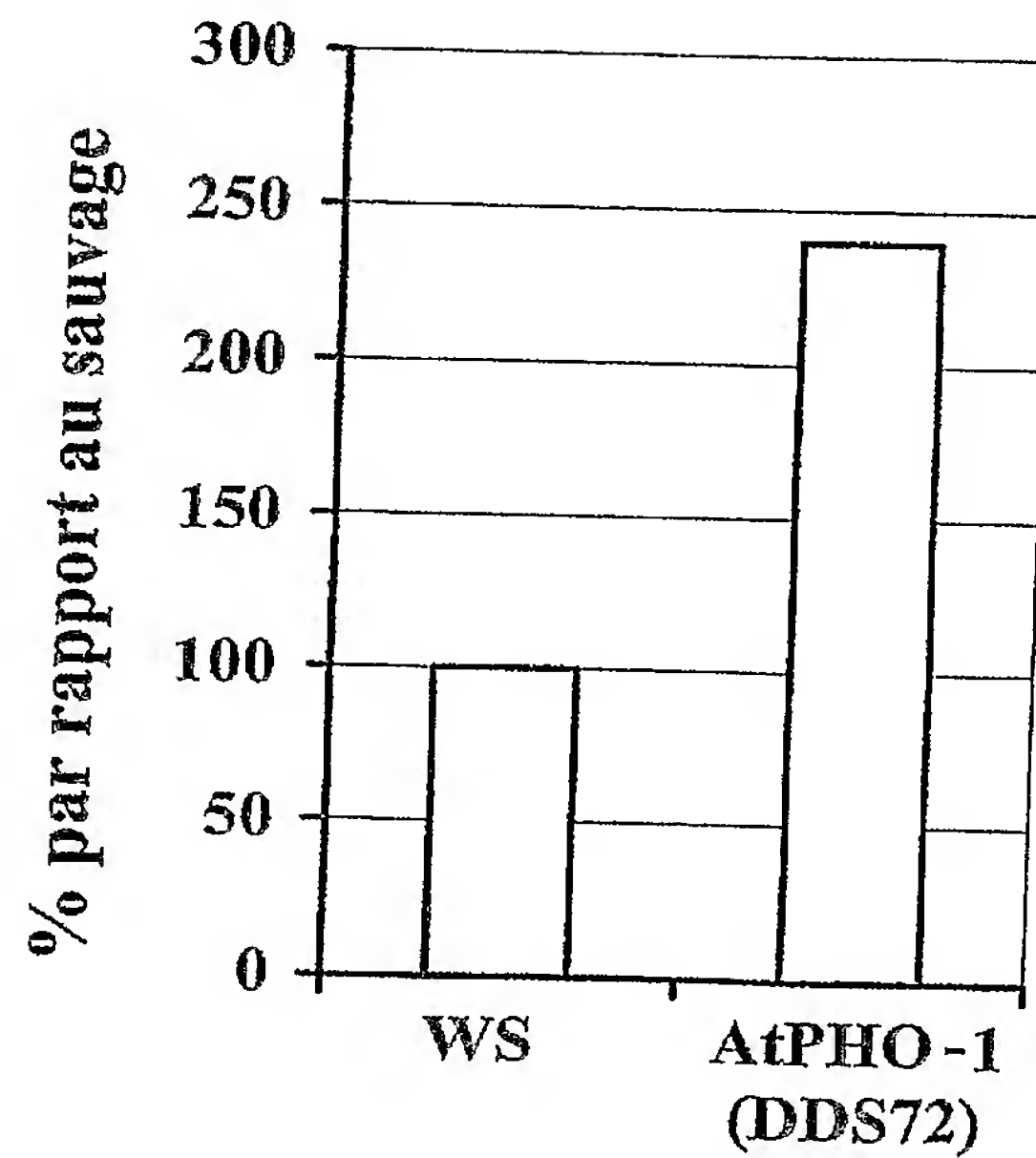
- Ruiz et al. (1998) Plant Cell 10, 937-946
- Sanford J.C., (1988) Trends in Biotechnology, 6, 299-302
- 5 - Sonnewald et al., (1995) Plant. Mol. Biol. 27, 567-576
- Thorneycroft et al., (2001) Journal of Experimental Botany, 52, 361 :1593-1601
- 10 - Waterhouse et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 13959-13964
- Watson et al. ADN recombinant, Ed. De Boeck Université, p 273-292
- 15 - Zamore et al., (2000) Cell 101, 25-33 Ecole thématique Biologie végétale - 2001

REVENDICATIONS

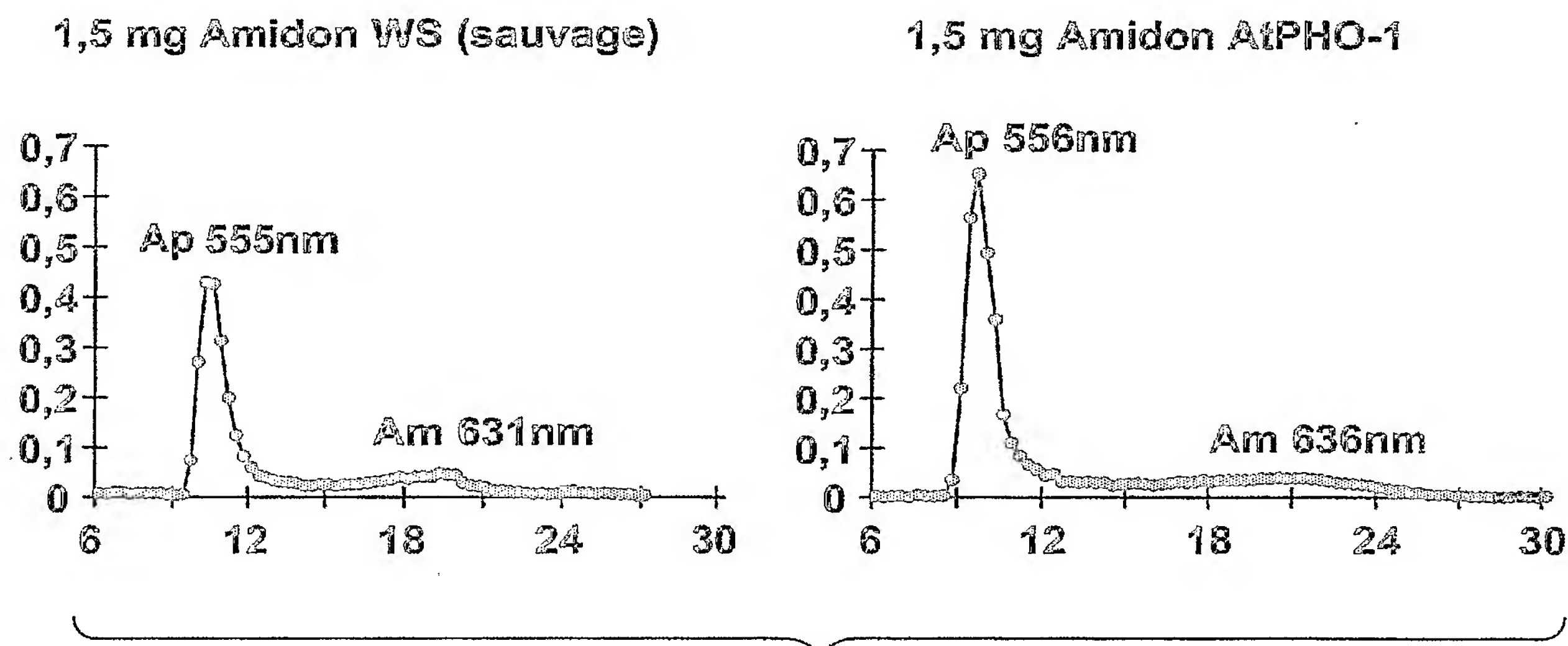
1. Procédé pour augmenter la taille des grains d'amidon et/ou la teneur en amidon d'une plante ou d'une partie de plante, dans lequel on inactive le gène d'une amidon phosphorylase dans les cellules de la plante.
2. Procédé pour l'obtention de plantes ou parties de plante produisant des grains d'amidon de taille accrue ou à teneur élevée en amidon, ledit procédé comprenant l'inactivation du gène d'une amidon phosphorylase dans les cellules de la plante.
3. Procédé selon la revendication 2, comprenant les étapes consistant à inactiver, par insertion de nucléotide(s), le gène codant pour ladite amidon phosphorylase endogène dans une cellule de plante, et régénérer la plante à partir de la cellule transformée, ladite plante transgénique ainsi obtenue présentant des grains d'amidon de taille accrue, et/ou une teneur en amidon élevée.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, dans lequel la plante est la pomme de terre, la fève, la betterave, l'épinard, le petit pois, le blé, le maïs ou le riz.
5. Cellule végétale susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendication 2 à 4.
6. Plante transgénique comprenant une cellule végétale selon la revendication 5.

7. Graine issue de la plante selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle a sa taille accrue, et/ou une teneur en amidon modifiée.
- 5
8. Utilisation de la séquence polynucléotidique SEQ ID N°2 pour la fabrication d'une plante avec une taille des grains d'amidon et/ou la teneur en amidon modifiée.
- 10
9. Utilisation selon la revendication 8 caractérisée en ce que la plante obtenue est choisie parmi la pomme de terre, la fève, la betterave, l'épinard, le petit pois, le blé, le maïs ou le riz.

1/3

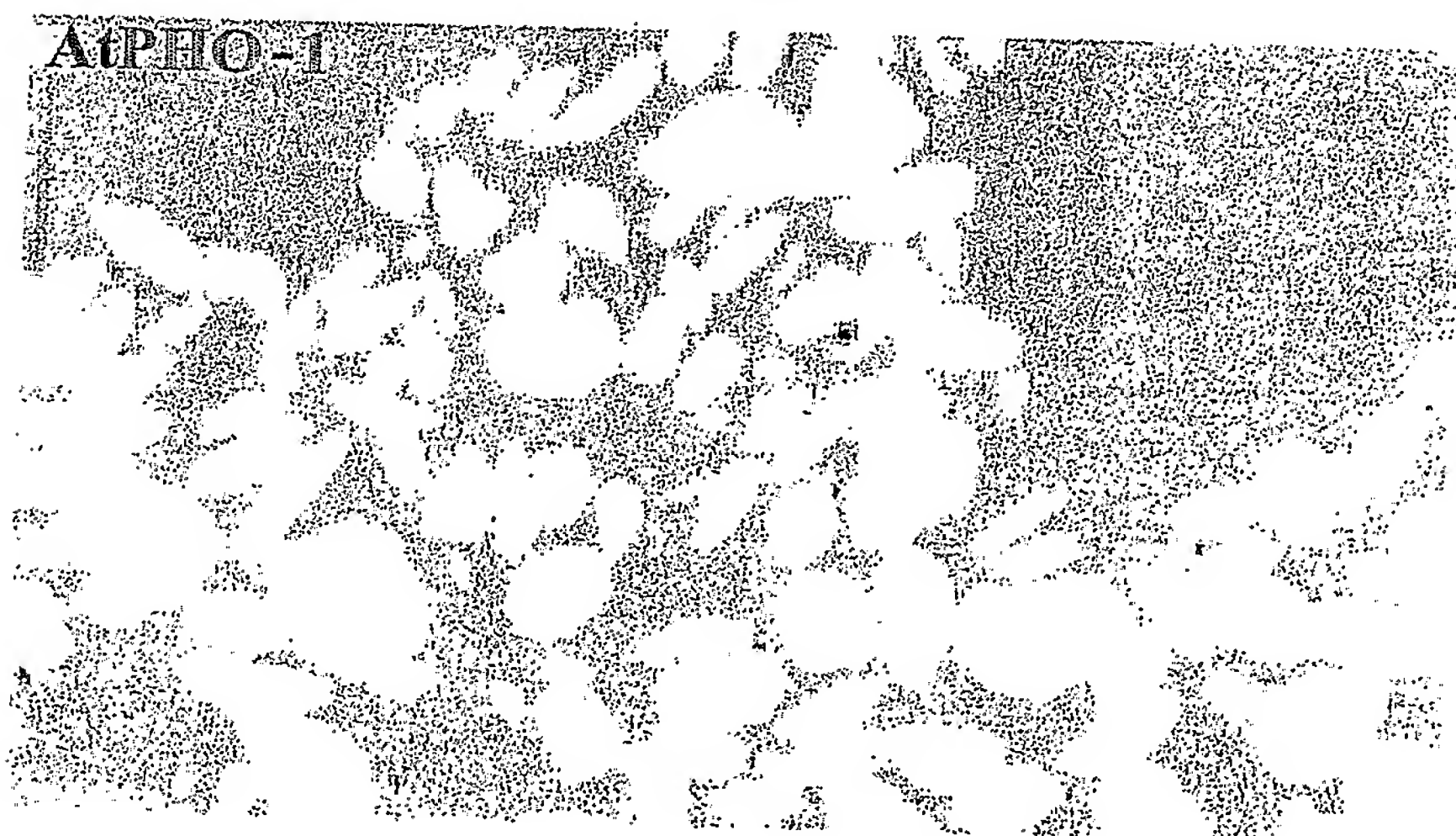
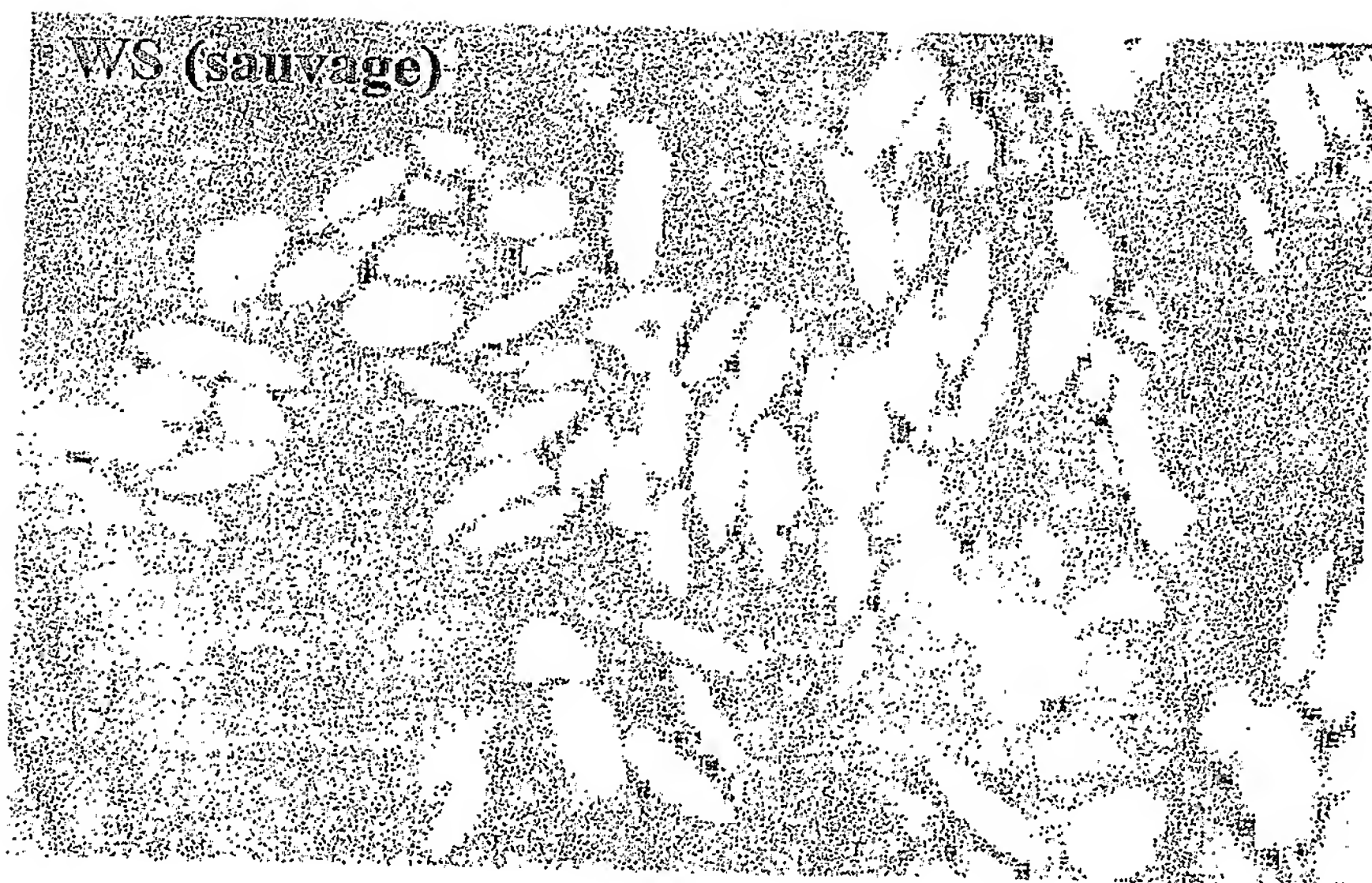
**FIG.1****FIG.2**

2/3

FIG.3

3/3

FIG.4



Déposant : GENOPLANTE-VALOR

Procédé d'amélioration des plantes.

1

Réf. : BFF 04P0143

"CABINET LAVOIX"
2, PLACE D'ESTIENNE D'ORVES
PARIS 9^e

SEQUENCE LISTING

<110> GENOPLANTE-VALOR-SAS

<120> Procédé d'amélioration des plantes

<130> BFF 04P0143

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 4717

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

atggatacga tgcgaatctc cgggtgtatca accggagctg aggttttaaat acaatgcaat 60

tccttatcaa gcctcgtttc tcgtcgttgc gacgacggaa aatggcgaac gagaatgttt 120

ccggcgagaa acagagactt gcgtccatcg ccgacgagaa gatccttttt gtcggtgaaa 180

tctatctcta gcgaaccgaa agccaaagta accgacgcag ttctcgattc cgaacaaggt 240

ctcattctaa tacttgcttt ctaataagaa ttagggtagc gaatttgaat tttatagtga 300

atgttgtaga gtaactgatt cgtattcctt gggattttgt ttttgtgttg attgattttc 360

agaagtgttt attagctcga tgaatccgtt tgcgccagat gctgcttcgg tagcttcgag 420

tatcaagtac cacgcggagt ttacgccatt gttttcacccg gagaagtttg agttgcaaaa 480

ggcgttcttt gcgactgcgc aaagtgttag agatgctttg atcatgaatt ggaatgcaac 540

ttatgagtat tacaacagag tgaatgtgaa acaagcgtat tatttgtcaa tggagttttt 600

gcaggttttg gtttttactc atttctttga gtgattttgt tcttggttgt tatctaacta 660

ttttacattg tagggtagag ccttatcgaa tgccgtgggt aaccttgggc ttaatagcgc 720

ttatggatgat gctttgaaga ggcttggttt tgatttggaa agcgtggcta gtcaggtag 780

ttgttaacca tggtgattat tatgcattaa ccgatgttta ttactaacag acgtcttaga 840

gatgatcgtc tttgcgagtc tattgttttg ttttacagag ctgttatctt ctttatatgt 900

actgagatgc tagatacttc acttccattt tgtaggagcc agatcctgca cttgggaatg 960

gtggactcgg gagacttgcc tcgtgttttt tggattccat ggcaactttg aattatccgg 1020

cttgggggta tggacttaga tacaagtatg gcttggttcaa acagagaatt acaaaagatg 1080

gacaggagga agctgcagaa gattggcttg aggtcttatt ctcttattct tttctcatac 1140

agcgtttgct attgaacagt atttcctaatt ttgtactctc ttgtagcaat gctgagcagt 1200

ggacatgttt attggcttac ctgtttcttt cagctaagca atccttggga aatagtcaga 1260

aatgatgtct catatcctat taagttctat gggaaagtgg tttttggatc agatggtaag 1320

aaacggtgga ttggtggaga agacattggt gctgttgctt atgatgttcc tatacctggt	1380
tataaaacta agacaactat caatctgcgg ctctgggtcaa caaaagctcc ttccgaagat	1440
tttgatttat cttcatataa ctctgggaag catactgagg cagcagaagc tctattcaac	1500
gctgaaaagg ttgtatctt cattaagttt catttaaagt tgctttcaca attttgtttt	1560
ttcgaccatg atctatttac aagatccttc tagtaattgg aatagtgcac atatctttaa	1620
aattgagtga gaaccagcag aatgaatat gttatcacag agagattagt cttgcgtcac	1680
ttgtgcttgt ttatataacg agcttttgat gtgtatatac tgaaaagtgg ttgttttctt	1740
cccttccttc ctgatggaat tagatttgct tcgtgcttta ccccgagat gagtcaactg	1800
aaggaaaggc tcttcgtctg aagcaacaat acactctgtg ctcagcctcg ctacaagata	1860
tcgtagcacg ttttgagaca aggtctggag gaaacgtcaa ctgggaagaa tttccagaga	1920
aggttgcagt gcagatgaat gacactcacc ctaccctatg cattcctgag ctaatgagga	1980
ttctaattgga tttaaaagga ctaagctggg aagacgcttg gaaaatcaca caaaggact	2040
aaaaatgact gaactaattg tcgggcatgc tacatatgtg tctatttggt cctatattta	2100
gtctctggtg cttgtcccaa ataaaagata gtttacaaga atgaaacctg caacgtgttt	2160
ctcaaaagtt aataattttt ttaggactgt ggcatacaca aaccatacag tcttgctga	2220
ggcactggag aagtggagtt tagaactcat ggagaaattg cttcctcgtc atgtggagat	2280
tatcgaaaag attgatgagg aggtcatccc tgaacaacat atcaaattgc tcttctattt	2340
ttttcatatc gggcttaatt tgtactttca tgtattgcag ctagttcgca caattgtttc	2400
agagtatggc accgcggatc ctgacttact tgaagaaaaa ctgaaggcaa tgaggatctt	2460
ggaaaatgtc gagttgcctt ctgcctttgc agatgtgatc gtgaagccgg tgaacaaacc	2520
agttactgca aaagatgctc aaaatggcgt gaaaacggaa caagaagagg aaaaaactgc	2580
tggagaggaa gaggaagacg aagttatccc agaaccaaca gtagaacccc ccaagatggt	2640
ccgtatggcc aaccttgctg ttgtgggtgg tcatgctgta aatggcgttg cagagatata	2700
cagtgaata gtgaagcagg acgtgtttta tgatttcgta caggtaaaca ttctaactag	2760
tgaagcatga tgctataaaa tgctctacag ggaagaacac aactctcatc gttcaatatt	2820
ctatatTTTT tgcagttgtg gccagaaaaa tttcagaaca aaacaaatgg agtaacacca	2880
aggcgatgga ttcgtttttg caaccatat ttaagtata ttataactaa ctggataggg	2940
acagaagact gggctttaaa taccgaaaag gttgcggaac taagaaagggt atgtacttta	3000
tcagattcaa tgttgtttca catgctgtta tctttattgg ggcacattgg ttatcattgt	3060
ttggtctttc tccagtttgc agataatgaa gatctccaat ctgagtggag ggcagcaaag	3120

aagaagaaca agttgaaggt tgtatcactt atcaaggaaa gaactggata tactgtcagc 3180
cccgatgcaa tgttcgacat tcaggtcagt tccaatggat cttgggttact tttagattga 3240
tgagttgttt gcttgggttt ttcggtttga gaagtccttt acgcaactct gagtagctta 3300
tgtagattct tttctttttg cattgaaaac tttttgcaga tcaagcgtat acatgagtac 3360
aagcgacaac tgctaaatat cttgggaatt gtttaccgct acaaaaagat gaaggaaatg 3420
agtgctagtg agagagagaa agcatttggt ccaagagttt gcatatttgg gggaaaagca 3480
tttgccacat atgtgcaagc taagagaatt gttaaattta tcacagatgt tgcgtctaca 3540
attaaccatg atccagaaat aggtgacctc cttaagggtat atatctactt acgttcttgt 3600
attagtcgta ttctcaagcg tataacggaa aatctgcaat aattatctgg tttttgcac 3660
tgtggagatt ggcacttact aattagaagt gttaactaaa catgtaggtt atctttgttc 3720
ctgattacaa tgtcagtgtt gctgaattgc tcattccagc aagtgagctt tctcagcaca 3780
tcaggtaaaa acttcttttg cttagtcaca ttatagtttt tggtcacaac tccatgaagt 3840
taaaatattg aaattgagat aaccggtaaa ccatgaactg gactagtttc tctttttttc 3900
ataagaactt tagaaacaaa tcctgacaca aggaacaata tgtttcgggtt acatttatga 3960
aaggttataa tcaatggcac tcatactttt tgctggagac taagagtttc tctctgcagt 4020
actgctggga tggaagctag tgggacaagc aacatgaaat tttcgatgaa cggttgcgtt 4080
ttgattggaa ccttggtatgg ggcgaatgtc gagattagag aagaagttgg agaagaaaat 4140
ttcttctctt ttggtgcaa agctgatcag attgtgaacc tcaggaagga gagagcagag 4200
ggaaagggtat atactatttg aagagttaac cttaccatgc ttctgtttta gcatcaacaa 4260
gaatttgatt tttgacctgg ctcttggcat tccagtttgt tcccgatcct acttttgaag 4320
aagtcaagaa gttcgttgga agcggcgtct ttggctcaaa tagctatgat gaactaatcg 4380
gctctttgga aggaaacgaa ggctttggac gagcggatta cttcctagtt ggcaaagact 4440
ttcctagtta catcgaatgc caagaaaaag tcgacgaggc ataccgagac cagaaagtaa 4500
gtactaatgc attttctttg aacatcaagc taataatgtt gactaaaata tgaaacttac 4560
tcaaatatca aaccttgaaa ttgctgttaa atgattacag agatggacga gaatgtcaat 4620
aatgaacaca gcaggttcat tcaagtttag cagtgaccgg acgatccacg aatacgccaa 4680
agacatatgg aatattaagc aagtggaact tccatga 4717

<210> 2
<211> 10870
<212> ADN
<213> Arabidopsis thaliana
<220>

<221> misc_feature
 <222> (2040)..(8192)
 <223> séquence ADN-T

<400> 2-
 atggatacga tgcgaatctc cgggtgtatca accggagctg aggtttttaat acaatgcaat 60
 tccttatcaa gcctcgtttc tcgtcgttgc gacgacggaa aatggcgaac gagaatgttt 120
 ccggcgagaa acagagactt gcgtccatcg ccgacgagaa gatccttttt gtcggtgaaa 180
 tctatctcta gcgaaccgaa agccaaagta accgacgcag ttctcgatto cgaacaagggt 240
 ctcatcttaa tacttgcttt ctaataagaa ttagggtagc gaatttgaat tttatagtga 300
 atgttgtaga gtaactgatt cgtattcctt gggattttgt ttttgtgttg attgattttc 360
 agaagtgttt attagctcga tgaatccgtt tgcgccagat gctgcttcgg tagcttcgag 420
 tatcaagtac cacgcggagt ttacgccatt gttttcaccg gagaagtttg agttgccaaa 480
 ggcgttcttt gcgactgcgc aaagtgttag agatgctttg atcatgaatt ggaatgcaac 540
 ttatgagtat tacaacagag tgaatgtgaa acaagcgtat tatttgtcaa tggagttttt 600
 gcaggttttg gtttttactc atttctttga gtgattttgt tcttggttgt tatctaacta 660
 ttttacattg tagggtagag ccttatcgaa tgccgtgggt aaccttgggc ttaatagcgc 720
 ttatggtgat gctttgaaga ggcttggttt tgatttggaa agcgtggcta gtcaggtag 780
 ttgttaacca tgttgattat tatgcattaa ccgatgttta ttactaacag acgtcttaga 840
 gatgatcgtc tttgcgagtc tattgtttgg ttttacagag ctgttatctt ctttatatgt 900
 actgagatgc tagatacttc acttccattt tgtaggagcc agatcctgca cttgggaatg 960
 gtggactcgg gagacttgcc tcgtgttttt tggattccat ggcaactttg aattatccgg 1020
 cttgggggta tggacttaga tacaagtatg gcttgttcaa acagagaatt acaaaagatg 1080
 gacaggagga agctgcagaa gattggcttg aggtcttatt ctcttattct tttctcatac 1140
 agcgtttgct attgaacagt atttcctaatt ttgtactctc ttgtagcaat gctgagcagt 1200
 ggacatgttt attggcttac ctgtttcttt cagctaagca atccttggga aatagtcaga 1260
 aatgatgtct catatcctat taagttctat gggaaagtgg tttttggatc agatggtaag 1320
 aaacggtgga ttggtggaga agacattggt gctgttgctt atgatgttcc tatacctggt 1380
 tataaaacta agacaactat caatctgcgg ctctggtcaa caaaagctcc ttccgaagat 1440
 tttgatttat cttcatataa ctctgggaag catactgagg cagcagaagc tctattcaac 1500
 gctgaaaagg tttgtatctt cattaaagtt catttaaagt tgctttcaca attttgtttt 1560
 ttcgaccatg atctatttac aagatccttc tagtaattgg aatagtgcac atatctttaa 1620
 aattgagtga gaaccagcag aatgaatat gttatcacag agagattagt cttgcgtcac 1680

ttgtgcttgt	ttatataacg	agctttttgat	gtgtatatac	tgaaaagtgg	ttgtttttctt	1740
cccttccttc	ctgatggaat	tagattttgct	tcgtgcttta	ccccggagat	gagtcaactg	1800
aaggaaaggc	tcttcgtctg	aagcaacaat	acactctgtg	ctcagcctcg	ctacaagata	1860
tcgtagcacg	ttttgagaca	aggtctggag	gaaacgtcaa	ctgggaagaa	tttccagaga	1920
aggttgcagt	gcagatgaat	gacactcacc	ctaccctatg	cattcctgag	ctaatgagga	1980
ttctaattgga	tttaaaagga	ctaagctggg	aagacgcttg	gaaaatcaca	caaagggtact	2040
ggcaggatat	atgccaacgt	aaaaatgagg	gcaatcgatt	gtactgaatc	ggatttttcaa	2100
gggtctggcc	aaaactattc	cgtggggcacc	tggcacacgc	cctggagtc	ggcccgtttc	2160
cagttgaggg	ttgtctacgc	ttagatgaga	aggaaagttg	tccaagacga	atcccagtg	2220
cctattacca	atagccgacg	gtatcgataa	gcttgatgta	catggtcgat	aagaaaaggc	2280
aatttgtaga	tgtaatttcc	catcttgaaa	gaaatatagt	ttaaatatatt	attgataaaa	2340
taacaagtca	ggtattatag	tccaagcaaa	aacataaatt	tattgatgca	agtttaaatt	2400
cagaaatatt	tcaataactg	attatatcag	ctgggtacatt	gcgtagatg	aaagactgag	2460
tgcgatatta	tgtgtaatac	ataaattgat	gatatagcta	gcttagctca	tcgggggatc	2520
catcgatcc	tagacgcgtg	agatcagatc	tcggtgacgg	gcaggaccgg	acggggcggt	2580
accggcaggc	tgaagtccag	ctgccagaaa	cccacgtcat	gccagttccc	gtgcttgaag	2640
ccggccgccc	gcagcatgcc	gcgggggggca	tatccgagcg	cctcgtgcat	gcgcacgctc	2700
gggtcgttgg	gcagcccgat	gacagcgacc	acgctcttga	agccctgtgc	ctccagggac	2760
ttcagcaggt	gggtgtagag	cgtggagccc	agtcccgtcc	gctggtggcg	gggggagacg	2820
tacacggtcg	actcggccgt	ccagtcgtag	gcgttgcggtg	ccttccaggg	gcccgcgtag	2880
gcgatgccgg	cgacctcgcc	gtccacctcg	gcgacgagcc	agggatagcg	ctcccgcaga	2940
cggacgaggt	cgtccgtcca	ctcctgcggt	tcctgcggct	cggtaacggaa	gttgaccgtg	3000
cttgtctcga	tgtagtgggt	gacgatgggtg	cagaccgccc	gcatgtccgc	ctcgggtggca	3060
cggcggatgt	cggccggggcg	tcgttctggg	ctcatggatc	cgattttag	agagagactg	3120
gtgatttcag	cgtgtcctct	ccaaatgaaa	tgaacttcct	tatatagagg	aagggtcttg	3180
cgaaggatag	tgggattgtg	cgtcatccct	tacgtcagtg	gagatatcac	atcaatccac	3240
ttgctttgaa	gacgtgggtg	gaacgtcttc	tttttccacg	atgctcctcg	tgggtggggg	3300
tccatctttg	ggaccactgt	cggcagaggc	atcttgaacg	atagcctttc	ctttatcgca	3360
atgatggcat	ttgtaggtgc	caccttcctt	ttctactgtc	cttttgatga	agtgacagat	3420
agctgggcaa	tggaatccga	ggaggtttcc	cgatattacc	ctttgttgaa	aagtctcaat	3480

agccctttgg	tcttctgaga	ctgtatcttt	gatattcttg	gagtagacga	gagtgtcgtg	3540
ctccaccatg	ttgacgaaga	ttttcttctt	gtcattgagt	cgtaaaagac	tctgtatgaa	3600
ctgttcgcca	gtcttcacgg	cgagttctgt	tagatcctcg	atctgaattt	ttgactccat	3660
ggcctttgat	tcagtaggaa	ctactttctt	agagactcca	atctctatta	cttgccttgg	3720
tttatgaagc	aagccttgaa	tcgtccatac	tggaatagta	cttctgatct	tgagaaatat	3780
atctttctct	gtgttcttga	tgcagttagt	cctgaatctt	ttgactgcat	ctttaacctt	3840
cttgggaagg	tatttgatct	cctggagatt	attactcggg	tagatcgtct	tgatgagacc	3900
tgccgcgtag	gcctctctaa	ccatctgtgg	gtcagcattc	tttctgaaat	tgaagaggct	3960
aatctttctca	ttatcgggtg	tgaacatggt	atcgtcacct	tctccgtcga	actttcttcc	4020
tagatcgtag	agatagagaa	agtcgtccat	ggtgatctcc	ggggcaaagg	agatccgtca	4080
attccgattc	attaatgcag	ctggcacgac	aggtttcccg	actggaaagc	gggcagtgag	4140
cgcaacgcaa	ttaatgtgag	ttagctcact	cattaggcac	cccaggcttt	acactttatg	4200
cttccggctc	gtataatgtg	tggaattgtg	agcggataac	aatttcacac	aggaaacagg	4260
atcatgagcg	gagaattaag	ggagtcacgt	tatgaccccc	gccgatgacg	cgggacaagc	4320
cgttttacgt	ttggaactga	cagaaccgca	acgattgaag	gagccactca	gccgcggggt	4380
tctggagttt	aatgagctaa	gcacatacgt	cagaaaccat	tattgcgcgt	tcaaaagtcg	4440
cctaagggtca	ctatcagcta	gcaaataattt	cttgtcaaaa	atgctccact	gacgttccat	4500
aaattcccct	cggtatccaa	ttagagtctc	atattcactc	tcaatcaaag	atccggccca	4560
tgatcatgtg	gattgaacaa	gatggattgc	acgcaggttc	tccggccgct	tgggtggaga	4620
ggctattcgg	ctatgactgg	gcacaacaga	caatcggctg	ctctgatgcc	gccgtgttcc	4680
ggctgtcagc	gcagggggcg	ccggttcttt	ttgtcaagac	cgacctgtcc	ggtgccctga	4740
atgaactgca	ggacgaggca	gcgcggctat	cgtggctggc	cacgacgggc	gttccttgcg	4800
cagctgtgct	cgacgttgtc	actgaagcgg	gaagggactg	gctgctattg	ggcgaagtgc	4860
cggggcagga	tctcctgtca	tctcaccttg	ctcctgccga	gaaagtatcc	atcatggctg	4920
atgcaatgcg	gcggctgcat	acgcttgatc	cggctacctg	cccattecgac	caccaagcga	4980
aacatcgcac	cgagcgagca	cgtactcgga	tggaagccgg	tcttgctgat	caggatgatc	5040
tggaacgaaga	gcatacgggg	ctcgcgccag	ccgaactggt	cgccaggctc	aaggcgcgca	5100
tgcccagcgg	cgaggatctc	gtcgtgaccc	atggcgatgc	ctgcttgccg	aatatcatgg	5160
tggaatatgg	ccgcttttct	ggattcatcg	actgtggccg	gctgggtgtg	gcggaccgct	5220
atcaggacat	agcgttggct	acccgtgata	ttgctgaaga	gcttggcggc	gaatgggctg	5280
accgcttcct	cgtgctttac	ggtatcgccg	ctcccgatcc	gcagcgcac	gccttctatc	5340

gccttcttga	cgagttcttc	tgagcgggac	tctgggggttc	gaaatgaccg	accaagcgac	5400
goccaaacctg	ccatcacgag	atttcgattc	caccgccgcc	ttctatgaaa	ggttgggctt	5460
cggaatcggt	ttccgggacg	cgggctggat	gatcctccag	cgcggggatc	tcatgctgga	5520
gttcttcgcc	cacccctgc	tttaatgaga	tatgcgagac	gcctatgata	gcatgatatt	5580
tgctttcaat	tctgttggtc	acgttgtaaa	aaacctgagc	atgtgtagct	cagatcctta	5640
cgcgcgggtt	cggttcattc	taatgaatat	atcacccggt	actatcgat	ttttatgaat	5700
aatattctcc	gttcaattta	ctgattgtac	cctactactt	atatgtacaa	tattaaaatg	5760
aaaacaatat	attgtgctga	ataggtttat	agcgacatct	atgatagagc	gccacaataa	5820
caaacaattg	cgttttatta	ttacaaatcc	aatttttaaaa	aaagcggcag	aaccgggtcaa	5880
acctaaaaga	ctgattacat	aaatcttatt	caaatttcaa	aaggccccag	gggctagtat	5940
ctacgacaca	ccgagcggcg	aactaataac	gttcactgaa	gggaactccg	gttccccgcc	6000
ggcgcgcatg	ggtgagattc	cttgaagttg	agtattggcc	gtccgctcta	ccgaaagtta	6060
cgggcaccat	tcaaccgggt	ccagcacggc	ggccgggtaa	ccgacttgct	gccccgagaa	6120
ttatgcagca	tttttttggt	gtatgtgggc	cccaaataaa	gtgcagggtca	aaccttgaca	6180
gtgacgacaa	atcgttgggc	gggtccaggg	cgaattttgc	gacaacatgt	cgaggctcag	6240
caggggctcg	atcccctcga	tcgaattcga	tctagtaaca	tagatgacac	cgcgcgcgat	6300
aattttatcct	agttttgcgcg	ctatattttg	ttttctatcg	cgtattaaat	gtataattgc	6360
gggactctaa	tcataaaaac	ccatctcata	aataacgtca	tgcattacat	gttaattatt	6420
acatgcttaa	cgtaattcaa	cagaaattat	atgataatca	tcgcaagacc	ggcaacagga	6480
ttcaatctta	agaaacttta	ttgccaaatg	tttgaacgat	cgagctcaat	tccccaccga	6540
ggctgtagcc	gacgatgggtg	cgccaggaga	gttggttgatt	cattggtttgc	ctccctgctg	6600
cggtttttca	ccgaagttca	tgccagttca	gcgtttttgc	agcagaaaag	ccgccgactt	6660
cggttttgcgg	tcgcgagtga	agatcccttt	cttggttaccg	ccaacgcgca	atatgccttg	6720
cgaggctcga	aaatcggcga	aattccatac	ctgttcaccg	acgacggcgc	tgacgcgata	6780
aaagacgcgg	tgatacatat	ccagccatgc	acactgatac	tcttcactcc	acatgtcggt	6840
gtacattgag	tgcagcccgg	ctaacgtatc	cacgcogtat	tcggtgatga	taatcggctg	6900
atgcagtttc	tcctgccagg	ccagaagttc	tttttccagt	accttctctg	ccgtttccaa	6960
atcgccgctt	tggacatacc	atccgtaata	acggttcagg	cacagcacat	caaagagata	7020
gctgatggta	tcggtgtgag	cgtcgcagaa	cattacattg	acgcagggtga	tcggacgcgt	7080
cgggtcgagt	ttacgcgttg	cttccgccag	tggcgaaata	ttcccggtga	cttgccggacg	7140

ggtatccggt tcgttggcaa tactccacat caccacgctt ggggtggtttt tgtcacgcgc	7200
tatcagctct ttaatcgctt gtaagtgcgc ttgctgagtt tccccgttga ctgcctcttc	7260
gctgtacagt tctttcggct tgttgcccgc ttcgaaacca atgcctaaag agagggttaa	7320
gccgacagca gcagtttcat caatcaccac gatgccatgt tcatctgccc agtcgagcat	7380
ctcttcagcg taagggtaat gcgaggtagc gtaggagttg gcccacatcc agtccattaa	7440
tgctgggtcg tgcacatca gcacgttatc gaatcctttg ccacgtaagt ccgcatcttc	7500
atgacgacca aagccagtaa agtagaacgg tttgtgggta atcaggaact gttggccctt	7560
cactgccact gaccggatgc cgacgcgaag cgggtagata tcacactctg tctggctttt	7620
ggctgtgacg cacagttcat agagataacc ttcaccgggt tgccagaggt gcggattcac	7680
cacttgcaaa gtcccgctag tgccttgtcc agttgcaacc acctgttgat ccgcatcacg	7740
cagttcaacg ctgacatcac cattggccac cacctgccag tcaacagacg cgtgggttaca	7800
gtcttgccgc acatgcgtca ccacgggtgat atcgccacc cagggtgttcg gcgtgggtgta	7860
gagcattacg ctgcgatgga ttccggcata gttaaagaaa tcatggaagt aagactgctt	7920
tttcttgccg ttttcgtcgg taatcaccat tcccgccggg atagtctgcc agttcagttc	7980
gttggtcaca caaacgggtga tacgtacact tttcccgcca ataacatacg gcgtgacatc	8040
ggcttcaa at ggcttatagc cgccctgatg ctccatcact tcttgattat tgacccacac	8100
tttgccgtaa tgagtgaacc catcgaaacg cagcacgata cgctggcctg cccaaccttt	8160
cggatataaag acttcgcgct gataccagac gttaaaaatg actgaactaa ttgtcgggca	8220
tgctacatat gtgtctattt gttcctatat ttagtctctg gtgcttgtcc caaataaaag	8280
atagtttaca agaatgaaac ctgcaacgtg tttctcaaaa gttataaatt tttttaggac	8340
tgtggcatac acaaaccata cagtcttgcc tgaggcactg gagaagtgga gtttagaact	8400
catggagaaa ttgcttcctc gtcattgtgga gattatcgaa aagattgatg aggaggtcat	8460
ccctgaacaa catatcaaat gtctcttcta tttttttcat atcgggtcta atttgtactt	8520
tcatgtattg cagctagttc gcacaattgt ttcagagtat ggcacgcgg atcctgactt	8580
acttgaagaa aaactgaagg caatgaggat cttggaaaat gtcgagttgc cttctgcctt	8640
tgcagatgtg atcgtgaagc cggatgaaca accagttact gcaaaagatg ctcaaaatgg	8700
cgtgaaaacg gaacaagaag aggaaaaaac tgctggagag gaagaggaag acgaagttat	8760
cccagaacca acagtagaac cccccaagat ggtccgtatg gccaaccttg ctgttgtggg	8820
tggtcatgct gtaaattggcg ttgcagagat acacagtga atagtgaagc aggacgtgtt	8880
taatgatttc gtacaggtaa acattctaac tagtgaagca tgatgctata aaatgctcta	8940
cagggaagaa cacaactctc atcgttcaat attctatatt ttttgagtt gtggccagaa	9000

aaatttcaga	acaaaacaaa	tggagtaaca	ccaaggcgat	ggattcgttt	ttgcaacca	9060
tatttaagt	atattataac	taactggata	ggcacagaag	actgggtctt	aaataccgaa	9120
aaggttgcgg	aactaagaaa	ggtatgtact	ttatcagatt	caatgttggt	tcacatgctg	9180
ttatctttat	tgggcgacat	tggttatcat	tgtttgggtct	ttctccagtt	tgcagataat	9240
gaagatctcc	aatctgagt	gagggcagca	aagaagaaga	acaagttgaa	ggttgatatca	9300
cttatcaagg	aaagaactgg	atatactgtc	agccccgatg	caatgttcga	cattcaggtc	9360
agttccaatg	gatcttggtt	acttttagat	tgatgagttg	tttgcttggg	tttttcggtt	9420
tgagaagtcc	tttacgcaac	tctgagtagc	ttatgtagat	tcttttcttt	ttgcattgaa	9480
aactttttgc	agatcaagcg	tatacatgag	tacaagcgac	aactgctaaa	tatcttgggg	9540
attgtttacc	gctacaaaaa	gatgaaggaa	atgagtgcta	gtgagagaga	gaaagcattt	9600
gttccaagag	tttgcataat	tgggggaaaa	gcatttgcca	catatgtgca	agctaagaga	9660
attgttaa	ttatcacaga	tgttgogtct	acaattaacc	atgatccaga	aataggtgac	9720
ctccttaagg	tatatatcta	cttacgttct	tgtattagtc	gtattctcaa	gcgtataacg	9780
gaaaatctgc	aataattatc	tggtttttgc	atctgtggag	attggcactt	actaattaga	9840
agtgttaact	aaacatgtag	gttatctttg	ttcctgatta	caatgtcagt	gttgctgaat	9900
tgctcattcc	agcaagtgag	ctttctcagc	acatcaggta	aaaacttctt	tggcttagtc	9960
acattatagt	ttttgggtcac	aactccatga	agttaaaata	ttgaaattga	gataaccggt	10020
aaaccatgaa	ctggactagt	ttctcttttt	ttcataagaa	ctttagaaac	aaatcctgac	10080
acaaggaaca	atatgtttcg	gttacattta	tgaaagggtta	taatcaatgg	cactcatact	10140
ttttgctgga	gactaagagt	ttctctctgc	agtactgctg	ggatggaagc	tagtgggaca	10200
agcaacatga	aattttcgat	gaacggttgc	gttttgattg	gaaccttgga	tggggcgaat	10260
gtcgagatta	gagaagaagt	tggagaagaa	aatttcttcc	tctttgggtgc	caaagctgat	10320
cagattgtga	acctcaggaa	ggagagagca	gagggaaagg	tatatactat	ttgaagagtt	10380
aaccttacca	tgcttctggt	ttagcatcaa	caagaatttg	atttttgacc	tggctcttgg	10440
cattccagtt	tgttcccgat	cctacttttg	aagaagtcaa	gaagtctggt	ggaagcggcg	10500
tctttggctc	aaatagctat	gatgaactaa	tgggtctttt	ggaaggaaac	gaaggctttg	10560
gacgagcgga	ttacttccta	gttggcaaag	actttcctag	ttacatcgaa	tgccaagaaa	10620
aagtcgacga	ggcataccga	gaccagaaag	taagtactaa	tgcattttct	ttgaacatca	10680
agctaataat	gttgactaaa	atatgaaact	tactcaaata	tcaaaccttg	aaattgctgt	10740
taaatgatta	cagagatgga	cgagaatgtc	aataatgaac	acagcagggt	cattcaagtt	10800

tagcagtgac cggacgatcc acgaatacgc caaagacata tggaatatta agcaagtgga 10860
acttccatga 10870

